

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

23.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 8月22日

出願番号
Application Number: 特願2003-299363
[ST. 10/C]: [JP2003-299363]

出願人
Applicant(s): 学校法人日本大学

REC'D 07 OCT 2004

WIPO

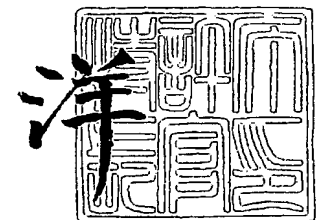
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 9月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0097
【提出日】 平成15年 8月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/50
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
 【氏名】 江角 眞理子
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
 【氏名】 高山 忠利
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
 【氏名】 高木 恵子
【特許出願人】
 【識別番号】 899000057
 【氏名又は名称】 学校法人日本大学
【代理人】
 【識別番号】 100092783
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 浩
 【電話番号】 03-3273-2611
【選任した代理人】
 【識別番号】 100095360
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 片山 英二
【選任した代理人】
 【識別番号】 100093676
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 純子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120134
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大森 規雄
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 157061
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

癌の評価方法であって、以下のステップ：

- (a) 検体から total RNA を採取し、
- (b) 表 1 ～ 8 に示される遺伝子の中の少なくとも 1 つ以上の遺伝子の発現量を測定し、
- (c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること

を含む前記方法。

【請求項 2】

癌の評価が、転移の有無又は再発の有無の予測である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

癌が肝細胞癌である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

表 1 ～ 8 に示されるいずれかの遺伝子を含む、癌の評価用キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】肝細胞癌に関連する遺伝子

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝細胞癌に関連する遺伝子、特に肝細胞癌の再発に関連する遺伝子に関する。

【背景技術】

【0002】

肝細胞癌のほとんどは、ウイルス性肝炎による慢性肝炎から発症する。その原因ウイルスは、C型肝炎ウイルスとB型肝炎ウイルスである。いずれも持続感染すると治療はなく、肝硬変、肝細胞癌発症の恐怖と立ち向かう他ない。インターフェロンが肝炎治療薬として使用されているが、有効例はわずか30%と、必ずしも十分な治療薬とはいえない。特に慢性肝炎ではほとんど有効例を見ないのが現状である。たとえウイルスが排除できなくとも、病態の進展を抑えることができれば、肝硬変や肝細胞癌の予防につながる。従って、病態の進展因子を分子レベルで明らかにすることが重要となる。

【0003】

一方、一度肝細胞癌が発生すると、外科的根治術がなされても、残肝再発は高頻度に出現する。肝癌の術後5年生存率は全国集計で51%であり、肝切除後1年で約25%、2年で50%、5年では80%の症例で再発が起こると報告されている。こうなると、残肝組織は正常肝組織とはいえず、すでに肝細胞癌再発の芽が存在するとも考えられる。現在、再発危険因子としては、腫瘍最大径、個数、門脈腫瘍栓、術前AFP値、肝内転移、肝硬変の有無などが報告されている。しかし、肝細胞癌再発の予測および予防法を開発するには、これら危険因子にも関連する、再発の有無を決めている因子を分子レベルでとらえる必要がある。これは、再発だけでなく、肝細胞癌発症や病態の進展そのものにも関わる因子であると考えられる。近年、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、病態を遺伝子全体の発現パターンの違いで、より詳細に分類できるようになってきた。これまで癌の分類には主に組織学的、免疫学的手法が用いられてきたが、同じ型に分類された癌でも臨床経過、治療効果が症例によって異なっている。これらを詳細に分類できる手法があれば、個々に応じた治療が可能となる。DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析は、このような癌の予後を知る上に、強力な方法と考える。

【0004】

今までに、肝細胞癌に関わるDNAマイクロアレイ解析では、

(i) 癌部、非癌部間において、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献1、非特許文献3)

(ii) 癌組織の分化度において、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献1、非特許文献2)

(iii) B型肝炎由来の肝細胞癌と、C型肝炎由来の肝細胞癌とでは、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献2)

(iv) 肝細胞癌血管浸潤の有無により、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献2)

(v) 多結節性肝細胞癌のクローン解析を行い、肝内転移癌に共通して見られる遺伝子の発現変化は何か？(非特許文献4)

などが明らかにされている。しかしながら、再発に関与する遺伝子は、飯塚ら(非特許文献5)の癌組織での解析にとどまる。残肝組織を反映する非癌部肝組織での解析は、まだなされていない。

【非特許文献1】Shirot Y, Kaneko S, Honda M, et al. Identification of differentially expressed gene in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. Hepatology 2001; 33 : 832-840

【非特許文献2】Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : Ide

ntification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. Cancer res. 2001 ; 61 : 2129- 2137

【非特許文献3】 Xu X, Huang J, Xu Z, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. Proc . Nat. Acad. Sci. USA . 2001; 98: 15089-15094

【非特許文献4】 Cheung S, Chen X, Guan X, et al. Identify metastasis-associated gene in hepatocellular carcinoma through clonality delineation for multinodular tumor. Cancer res. 2002 ; 62 : 4711- 4721

【非特許文献5】 Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. Lancet 2003; 361: 923-929

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、肝細胞癌に関連する遺伝子、特に癌の再発を予知する遺伝子を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、肝細胞癌の再発を起こした症例と再発のなかった症例から遺伝子発現のプロファイルを検討した結果、肝細胞癌に関連する遺伝子を同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体からtotal RNAを採取し、

(b) 表1～8に示される遺伝子の中の少なくとも1つ以上の遺伝子の発現量を測定し、

(c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること

を含む前記方法。

【0008】

癌の評価は、転移の有無又は再発の有無の予測である。また、癌としては、例えば肝細胞癌が挙げられる。

(2) 表1～8に示されるいずれかの遺伝子を含む、癌の評価用キット。

【発明の効果】

【0009】

本発明により、肝細胞癌の再発を予知するために有用な遺伝子が提供される。この遺伝子の発現亢進状態を解析することで、癌を評価することができる。特に、本発明の遺伝子を用いることにより、肝細胞癌の再発を予知することができ、その後の治療方針に役立てることができる。また、これらの遺伝子および遺伝子産物を用いて、再発予防の治療法を開発できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

本発明は、肝細胞癌切除後の長期間のフォローアップ臨床データから、予後不良の症例群（例えば1年以内に再発して2年以内に死亡する症例群）と、予後不良の症例群（例えば4年以上再発がない症例群）とに分け、切除した肝組織に発現する遺伝子群の特徴から、予後を不良にする遺伝子又は予後を良好にする遺伝子（例えば再発促進に関わる遺伝子と再発抑制に関わる遺伝子）を同定することを特徴とする。本発明は、臨床データをもとにして、原因ウイルス別にB型肝炎症例とC型肝炎症例とに分け、各々非癌部の組織及び癌

部の組織から、予後の相関関係を有する遺伝子を同定するというものである。

【0012】

本発明の遺伝子は、どの症例の、どの病態のときの、どの遺伝子を調べると、遺伝子と病態との相関関係がわかるのかについて、実際に患者から採取した組織と病態との相関関係を解析することによって、明らかにされたものである。

1. 被検サンプルの分類

被検サンプルは、肝癌手術後の経過を観察し、再発早期群と遅延群とに分類する。

【0013】

再発早期群とは、切除術後、一定期間内に再発してその後死亡する症例群を意味する。再発までの期間としては特に限定されるものではないが、例えば1年以内又は2年以内を例示することができる。死亡するまでの期間も特に限定されるものではないが、例えば、再発から1年以内、2年以内又は3年以内などが挙げられる。遅延群とは、一定期間以上（例えば3年以上、好ましくは4年以上）再発がない症例群を意味する。

【0014】

実際には33症例のstage Iおよびstage IIの肝細胞癌手術症例を対象とした。その内訳は、B型肝炎症例が6例、C型肝炎症例が23例、非B非C型肝炎症例が4例を含む。これらのフォローアップ臨床データをもとに、再発早期群としてB型肝炎症例から2例、C型肝炎症例から3例を、再発遅延群としてB型肝炎症例から2例、C型肝炎症例から3例を選んだ。これら10例の非癌部および癌部組織のRNAについて、以下の発現プロファイル解析を行った。

2. 遺伝子の解析

前記の通り分類された群の肝組織からtotal RNAを抽出し、各群間のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを比較する。total RNAの抽出は、市販の試薬（例えばトリゾール）を用いることにより行うことができる。発現プロファイルの検出は、例えばマイクロアレイ（アフィメトリクス社）を用いる。

【0015】

さらに、本発明は、癌部のほか非癌部の組織において変動する遺伝子を解析することができる。ここで、非癌部とは、肝細胞癌切除術時に含まれる肝組織であって、癌細胞が含まれていない部分を意味する。但し、「非癌部」は必ずしも正常肝組織であるとは限らず、慢性肝炎又は肝硬変を呈する組織がほとんどであるB型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子（24遺伝子）が含まれる。この場合は、壊死炎症反応や肝再生結節、脱落肝細胞を補う繊維化などが観察され、中には肝細胞癌発生に向けて予備軍となりうる細胞も存在する。従って非癌部組織にこそ予後と関係する遺伝子発現が存在すると考えられ、その遺伝子発現の変動を解析することで、予後（例えば再発）を予知することができる。

【0016】

遺伝子発現の変動と表現型（再発、早期進行等）との相関関係から、癌を評価するための遺伝子を同定する。癌の評価とは、癌の病態や進行度に関する評価を意味し、転移の有無、再発の有無などを予測することが挙げられる。

【0017】

本発明では、特に再発に関連して発現が促進又は抑制される遺伝子を提供する。再発とは、原発病巣に対する治療が完了したと判断された後に、同様の組織型と考えられる病巣が新たに肝内・肝外を問わず出現することをいう。

3. 遺伝子の評価

同定された遺伝子について、病態進展を抑える因子として使えるか、病態モデル細胞や動物で、評価する。すなわち、(1)予後のわかっている残りの肝細胞癌症例について遺伝子発現定量解析を行い、予後と相関するか否かを検討する。(2)肝細胞癌培養細胞株に遺伝子導入して発現させ、その細胞増殖性、悪性度の変化を、軟寒天培地下でのコロニー形成能やヌードマウスでの腫瘍形成能で評価する。(3)慢性肝炎患者より樹立した肝細胞培養株を用いて、遺伝子導入し発現させ、その細胞増殖性、悪性転換を、上記(2)の方法と

同様の方法で評価する。(4)肝細胞癌発癌モデル動物の肝臓に遺伝子導入して発現させ、肝発癌までの経過で評価する。

【0018】

本発明の遺伝子の全長配列は、以下のようにして得ることができる。すなわち、DNA データベースより検索し、既知の配列情報として得ることができる。あるいは、ヒト肝臓cDNAライブラリーより、ハイブリダイゼーションスクリーニングにより単離する。

【0019】

本発明において、再発が早期になかった症例（再発遅延）において発現が亢進される遺伝子としては、表1～表4に示されるものがあり、再発が早期にあった症例において発現が亢進される遺伝子としては、表5～8に示されるものがある。

【0020】

- 表1：B型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (24)
- 表2：C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (10)
- 表3：B型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (139)
- 表4：C型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (104)
- 表5：B型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (49)
- 表6：C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (12)
- 表7：B型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (75)
- 表8：C型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (38)

【0021】

【表 1】

表1 B型肝炎例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (24) (BNgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	TNFSF14	
2	MMP2	
3	SAA2	B型癌遅延群
4	COL1A1	
5	COL1A2	
6	DPYSL3	
7	PPARD	
8	LUM	
9	MSTP032	
10	CRP	
11	TRIM38	
12	S100A6	
13	PZP	
14	EMP1	
15	AJ590053	
16	MAP3K5	
17	TIMP1	
18	GSTM1	B型癌遅延群
19	CSDA	
20	GSTM2	B型癌遅延群
21	SGK	B型癌遅延群
22	LMNA	
23	MGP	
24	LTBP2	

【 0 0 2 2 】

【表 2】

表2 C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (10) (CNgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	M10098	C型癌遅延群
2	LMP7	
3	RALGDS	
4	APOL3	
5	GBP1	
6	RPS14	
7	CXCL9	
8	DKFZp564F212	
9	CYP1B1	
10	TNFSF10	

【 0 0 2 3 】

【表 3】

表3 B型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (139) (BTgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	HP	
2	M10098	C型癌遅延群
3	CYP2E1	
4	HDL	C型癌遅延群
6	GPX4	
7	G0S2	
8	HAO2	
9	ATF5	C型癌遅延群
10	MT1F	C型癌遅延群
11	CYP3A4	C型癌遅延群
12	Sod	
13	SERPINA7	
14	AKR1D1	
15	AL031602	
16	TSC501	
17	GSTM1	B型非癌遅延群 C型癌遅延群
18	SAA2	B型非癌遅延群
19	BHMT	C型癌遅延群
20	HADHSC	
21	FBXO9	
22	KIAA0442	
23	KIAA0293	C型癌遅延群
24	IGHG3	
25	ADH2	C型癌遅延群
26	GSTM2	B型非癌遅延群 C型癌遅延群
27	PPIF	
28	ALDH8A1	

【0024】

番号	遺伝子	重複グループ
29	IGLJ3	
30	HCN3	
31	ADH6	C型癌遅延群
32	AK02720	C型癌遅延群
33	NET-6	
34	CYP2D6	
35	MAFB	
36	GHR	
37	KHK	
38	ADFP	
39	LCE	
40	MPDZ	C型癌遅延群
41	TEM6	
42	KIAA0914	
43	KLKB1	
44	M11167	C型癌遅延群
45	SGK	B型非癌遅延群
46	EHHADH	
47	MBL2	C型癌遅延群
48	APP	
49	MT1G	
50	TPD52L1	C型癌遅延群
	CXCL10	
51	A1872416	
52		
53	FCGR2B	
54	IGL@	
55	FLJ10134	

【 0 0 2 5 】

番号	遺伝子	重複グループ
56	PPAP2B	
57	CDC42	
58	HBA2	
59	CYP1A2	C型癌遅延群
60	CYP2B6	
61	DKFZP586B1621	
62	MTP	
63	X07888	
64	RNAHP	C型癌遅延群
65	HLF	C型癌遅延群
66	PPP1R3C	
67	CDC2L2	
68	NRIP1	
69	GPD1	
70	KIAA1053	
71	CCL19	
72	CRI1	
73	THBS1	C型癌遅延群
74	SLC5A3	
75	GADD45B	
76	AGL	
77	ADK	
78	IGKC	
79	CYP2A6	C型癌遅延群
80	GADD45A	C型癌遅延群
81	FLJ20701	
82	LOC57828	

【 0 0 2 6 】

番号	遺伝子	重複グループ
83	SLC2A2	
84	GIRBP	
85	CGI-26	
86	DEFB1	
87	HMGCS1	
88	ODC1	
89	GLUL	O型癌遅延群
90	CYP27A1	
91	SULT2A1	O型癌遅延群
92	AK024828	
93	PHLDA1	
94	NR1I2	
95	MSRA	
96	RNASE4	
97	AI339732	
98	HBA2	
99	AL050025	
100	CSAD	
101	SID6-306	
102	NM024561	
103	BCKDK	
104	SLC6A1	
105	CG018	
106	GNE	
107	CKLF6	
108	COMT	
109	AL135960	
110	KIAA0179	

【 0 0 2 7 】

番号	遺伝子	重複グループ
111	c-maf	
112	OSBPL11	
113	R08655	C型癌遅延群
114	KIAA04461	
115	IGF1	C型癌遅延群
116	HBA1	
117	LOC55908	
119	ENPEP	
120	TXNIP	
121	KIAA0624	
122	ENPP1	
123	CYP4F3	
124	GAV2	
125	BE908931	
126	LECT2	
127	MLLT2	
128	FLR1	
129	TF	
130	DAO	
131	A1620911	
132	GBP1	
133	UGP2	
134	GADD45B	
135	SC4MOL	
136	BE908931	
137	TUBB	
138	EPHX2	
139	SORD	

【 0 0 2 8 】

【表 4】

表4 C型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (104) (CTgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	LEAP-1	
2	PPD	
3	HDL	B型癌遅延群
4	CYP3A4	B型癌遅延群
5	CYP2A6	B型癌遅延群
6	MI0098	C型非癌遅延群 B型癌遅延群
7	RACE	
8	SLC27A5	
9	FLJ20581	
10	FLJ10851	
11	KIAA0293	B型癌遅延群
12	C9	
13	AL354872	
14	AKR1C1	
15	PCK1	
16	GSTM1	B型癌遅延群
17	CYP1A2	B型癌遅延群
18	ANGPTL4	
19	AOX1	
20	SDS	
21	GSTM2	B型癌遅延群
22	M11167	B型癌遅延群
23	CYP2C9	
24	SIPL	
25	GLYAT	
26	MBL2	B型癌遅延群
27	CYP1A1	

【 0 0 2 9 】

番号	遺伝子	重複グループ
28	CRP	
29	R06655	B型癌遅延群
30	ACADL	
31	HLF	B型癌遅延群
32	NR1I3	
33	CA2	
34	CYP2C8	
35	PON1	
36	ADH2	B型癌遅延群
37	RNAHP	B型癌遅延群
38	AQP9	
39	SULT2A1	B型癌遅延群
40	SPP1	
41	KIAA0934	
42	AKAP12	
43	APOF	
44	FMO3	
45	SLC22A1	
46	DCXR	
47	CYP3A7	
48	SOCS2	
49	THBS1	B型癌遅延群
50	ATF5	B型癌遅延群
51	BCRP	
52	ADH6	B型癌遅延群
53	humNRDR	
54	GADD45G	

【 0 0 3 0 】

番号	遺伝子	重複グループ
55	SRD5A1	
56	ABCA8	
57	AK026720	B型癌遅延群
58	APOC4	
59	FTHFD	
60	ISG15	
61	IGFBP2	
62	BHMT	B型癌遅延群
63	: DNASE1L3	
64	SRD5A1	
65	E2IG4	
66	COL1A2	
67	C20orf46	
68	ESR1	
69	BLVRB	
70	LRP16	
71	SLC1A1	
72	ABCB6	
73	MPDZ	B型癌遅延群
74	FBP1	
75	ALAS1	
76	IFIT1	
787	PPARGC1	
78	Id-1H	
79	RBP1	
80	GSHMT	
81	LOC155066	
82	MT1F	B型癌遅延群

【 0 0 3.1 】

番号	遺伝子	重複グループ
83	AGXT2L1	
84	TIMM17A	
85	SEC14L2	
86	MAOA	
87	MYC	
88	ACAA2	
89	AL109571	
90	ABCA6	
91	IGF1	B型癌遅延群
92	GRHPR	
93	HADH2	
94	AFM	
95	COL1A1	
96	MTHFD1	
97	NMT2	
98	GADD45A	B型癌遅延群
99	UGT2B15	
100	AR	
101	TPD52L1	B型癌遅延群
102	sMAP	
103	GLUL	B型癌遅延群
104	dJ857E11.4	

【 0 0 3 2 】

【表 5】

表5 B型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (49) (BNbad)

番号	遺伝子	重複グループ
1	CTH	B型癌早期群
2	OAT	
3	PRODH	B型癌早期群
4	CYP3A7	
5	DDT	B型癌早期群
6	PGRMC1	
7	AKR1C1	
8	HGD	B型癌早期群
9	FHR-4	
10	AL354872	
11	FST	B型癌早期群
12	COX4	
13	APP	
14	PSPHL	
15	CYP1A1	
16	ZNF216	
17	LEPR	B型癌早期群
18	TOM1L1	
19	PECR	
20	ALDH7A1	
21	GNMT	
22	OATP-C	
23	AKR1B10	C型非癌早期群 B型癌早期群
24	ANGPTL3	
25	AASS	
26	CALR	

【0 0 3 3】

番号	遺伝子	重複グループ
27	BAAT	
28	PMM1	
29	RAB-R	
30	FLJ20406	
31	GLUL	
32	CSHMT	
33	UGT1A3	
34	HSPG1	
35	QPRT	C型非癌早期群
36	DEPP	
37	CA2	B型癌早期群
38	FTHFD	
39	LAMP1	
40	FKBP1A	
41	BNIP3	
42	MAP3K12	
43	ASS	B型癌早期群
44	ACTB	
45	PLAB	B型癌早期群
46	ENO1L1	
47	IGFBP3	
48	UK114	
49	ERF-1	

【 0 0 3 4 】

【表 6】

表6 C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (12) (CNbad)

番号	遺伝子	重複グループ
1	ALB	
2	NR0B2	
3	AKR1B10	B型非癌早期群
4	MAFB	
5	BF530535	
6	MRPL24	
7	DSIP1	
8	QPRT	B型非癌早期群
9	VNN1	
10	IRS2	
11	FMO5	
12	DCN	

【 0 0 3 5 】

【表 7】

表7 B型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (75) (BTbad)

番号	遺伝子	重複グループ
1	PRODHM	C型癌早期群
2	PLA2G2A	B型非癌早期群
3	SDS	
4	LGALS3BP	
5	BACE2	
6	LEPR	C型癌早期群
7	RCN1	
8	MRC1	
9	TM4SF5	
10	NK4	
11	PABL	
12	IGFBP2	
13	GRINA	
14	IFI27	
15	GP2	
16	GA	
17	P4HA2	
18	KYNU	
19	POK1	
20	UQBP	
21	HLA-DRB1	
22	HGD	C型癌早期群
23	HTATIP2	
24	GGT1	
25	CTSH	
26	MVP	
27	SLC22A1L	

【0036】

番号	遺伝子	重複グループ
28	GMNN	
29	COM1	
30	TM7SF2	
31	CTH	C型癌早期群
32	KDEL3	
33	VPS28	
34	CA2	C型癌早期群
35	SFN	
36	NM023948	
37	OPLAH	
38	DGCR6	
39	INSIG1	
40	AKR1B10	C型癌早期群
41	PTGDS	B型非癌早期群
42	SLC25A15	
43	SEPW1	
44	CD9	
45	UQCRL	
46	ASS	C型癌早期群
47	CPT1A	
48	PLAB	C型癌早期群
49	GPAA1	
50	HF1	
51	GPX2	
52	COPEB	
53	NDRG1	
54	SYNGR2	

【 0 0 3 7 】

番号	遺伝子	重複グループ
55	GOT1	
56	POLR2K	
57	AATF	
58	FST	C型癌早期群
59	OAZIN	
60	RPL7	
61	KIAA0128	
62	CLDN7	
63	ABCB6	
64	GK	
65	LU	B型非癌早期群
66	TNFSF4	
67	OSBPL9	
68	GSN	
69	LGALS4	
70	DDT	C型癌早期群
71	EIF3S3	
72	SLC12A2	
73	RAMP1	
74	HSPB1	
75	AI201594	

【0038】

【表 8】

表B C型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (3B) (CTbad)

番号	遺伝子	重複グループ
1	BL34	
2	AL022324	
3	IGHM	
4	TXNIP	
5	FSTL3	
6	AW978886	
7	NM018887	
8	L48784	
9	AJ275355	
10	PER1	
11	CYBA	
12	PLA2G2A	B型癌早期群
13	SGK	
14	FKBP11	
15	AI912086	
16	IGLJ3	
17	IGKC	
18	PTGDS	B型癌早期群
19	M20812	
20	AGRN	
21	IL2RG	
22	X07868	
23	PKM2	
24	FGFR3	
25	TRB@	
26	TNFAIP3	
27	TTC3	

【0 0 3 9】

番号	遺伝子	重複グループ
28	LPA	
29	AL049987	
30	IER5	
31	BSG	
32	TM4SF3	
33	HMGB2	
34	LU	B型癌早期群
35	CCL19	
36	PAM	
37	PIK3R1	
38	RANGAP1	

【0040】

上記遺伝子は、単独で、又は適宜組み合わせで癌の評価用キットに含めることができる。また、本発明のキットには、遺伝子増幅用プライマー、緩衝液、ポリメラーゼ等を含めてもよい。

【実施例1】

【0041】

以下のように、B型およびC型、非B非C型慢性肝炎及び肝細胞癌症例のヒト肝組織を用いて、肝細胞癌再発抑制分子の同定を遺伝子レベルで進めた。

【0042】

肝細胞癌術後の再発機構を知り、再発の有無を予測できる遺伝子を決めるため、再発時期の異なる症例を用いて遺伝子発現プロファイル解析を行なった。TNM分類でstage I、IIの33症例を対象とした。術後4年以上再発のない5例と、術後1年以内に再発した5例を選び、Affymetrix社HG-U133Aアレイで発現解析を行なった。

【0043】

凍結保存した組織にTRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD)を加えて、ポリトロンにてホモジネートした。ホモジネート液にクロロホルムを加えてよく混和し遠心した。遠心後、上層を回収し、イソプロパノールを等量加えて、RNA沈殿を遠心にて回収した。B型肝炎症例の再発早期群2例の非癌部と癌部、再発遅延群2例の非癌部と癌部、C型肝炎症例の再発早期群3例の非癌部と癌部、再発遅延群3例の非癌部と癌部、合計8群に分け、発現解析を行った。

【0044】

各サンプル群につき15 μ gのtotal RNAを用意し、Affymetrix社GeneChip Expression Analysis Technical Manualに基づいて、ビオチン標識cRNAを合成した。T7-(dt)₂₄プライマーとSuperscript II逆転写酵素 (Invitrogen Life Technology)を用いて、1時間反応させ第一鎖cDNAを合成した。その後、E. coli DNA リガーゼ、E. coli DNAポリメラーゼ、E. coli RNase Hを加え16℃ 2時間反応させ、最後にT4 DNAポリメラーゼを加えて二本鎖cDNAを合成した。クリーンアップを行った後、BioArray high yield RNA transcript labeling kit (Affymetrix, Inc, CA)を用いて、37℃ 4時間in vitro 転写し、ビオチン標識cRNA

を合成した。Technical manualに基づき、ハイブリダイゼーションプロブ溶液を作製し、プレハイブリダイゼーションを45℃ 45分間行ったGeneChip HG-U133A (Affymetrix, Inc, CA; 22283個のヒト遺伝子が含まれている)に加え、ハイブリダイゼーションを45℃ 16時間行った。その後、GeneChip Fluidics Station 400(Affymetrix, Inc, CA)を用いて洗浄した後、ストレプトアビジンフィコエリスリンとビオチン化抗ストレプトアビジンにて染色を行った。その後、HP GeneArray スキャナー(Affymetrix, Inc, CA)にてスキャンを行った。

【0045】

データ解析は、GeneSpring ver.5.0 (SiliconGenetics, Redwood, CA)を用いて行った。normalization後、内在性定量用コントロール遺伝子BioBのシグナルを検出限界(細胞あたり数コピーに相当する)として参考にし、100以上の輝度をもち、なおかつ、シグナルフラグが最低1チップでもpresentの遺伝子を対象とした。7444遺伝子を対象となり、非癌部では再発早期群/遅延群間で2.5倍以上差のある遺伝子を同定した。癌部では3倍以上差のある遺伝子を同定した。

【0046】

その結果、絞り込んだ7444遺伝子で、再発なし/ありの非癌部間で2.5倍以上差のある遺伝子は、up34個とdown59個、癌部間で3倍以上差のある遺伝子は、up217個とdown110個であった。これらの中でB型/C型共通に再発なしで発現亢進する遺伝子は、非癌部で0個、癌部で26個であった。一方、B型/C型共通に再発ありで発現亢進する遺伝子は、非癌部で2個、癌部で3個であった。また、癌部/非癌部共通に発現亢進する遺伝子があり、再発なしで5個、再発ありで10個であった。(表9)。

【0047】

【表9】

表9 肝細胞癌再発に関わる遺伝子

	再発遅延群で発現亢進		再発早期群で発現亢進		共通
	非癌部	癌部	非癌部	癌部	
B型肝炎	24	139	49	75	10
C型肝炎	10	104	12	38	0
共通	0	26	2	3	
合計	34	217	59	110	251
					169

合計 420

【0048】

表9の結果より、再発予後の違いは、非癌部より癌部のほうに遺伝子発現変化が大きく、C型肝炎症例よりはB型肝炎症例の方が遺伝子発現の差が大きいと言える。また、原因ウイルスとは無関係に共通して再発予後に関わる遺伝子が、見つかる場合があるが、意外に少ない。発癌と同様、再発も原因ウイルス別に異なる機構が関与していると考えられる。

【0049】

サンプル系統樹解析では、全遺伝子の発現プロファイルから、まず非癌部と癌部に分かれ、各々非癌部と癌部は、再発予後ではなく、原因ウイルスによる近縁関係が観察された

(図1)。図1において、各試験群を示す「BNbad」、「BNgood」などの表記において、第1番目のアルファベットはウイルスの種類を示し、「B」はB型肝炎ウイルス、「C」はC型肝炎ウイルスを意味する。第2番目のアルファベットの「N」は非癌部、「T」は癌部を意味する。そして「bad」は再発有り、「good」は再発なしを意味する。

【0050】

このことは、再発予後に影響する遺伝子発現は、限られた遺伝子の発現変化でもたらされるものと考えられる。

【0051】

以上のことから、再発の機構解明や有無を予測できる候補遺伝子が見出された(表1～8)。

【産業上の利用可能性】

【0052】

患者及び健常人由来の共通遺伝子と原因別特異遺伝子とを同定することで、予後の予測、再発の予測が可能になるため、診断、治療法開発、治療薬選択の戦略(テーラーメイド医療)に役立てることができる。

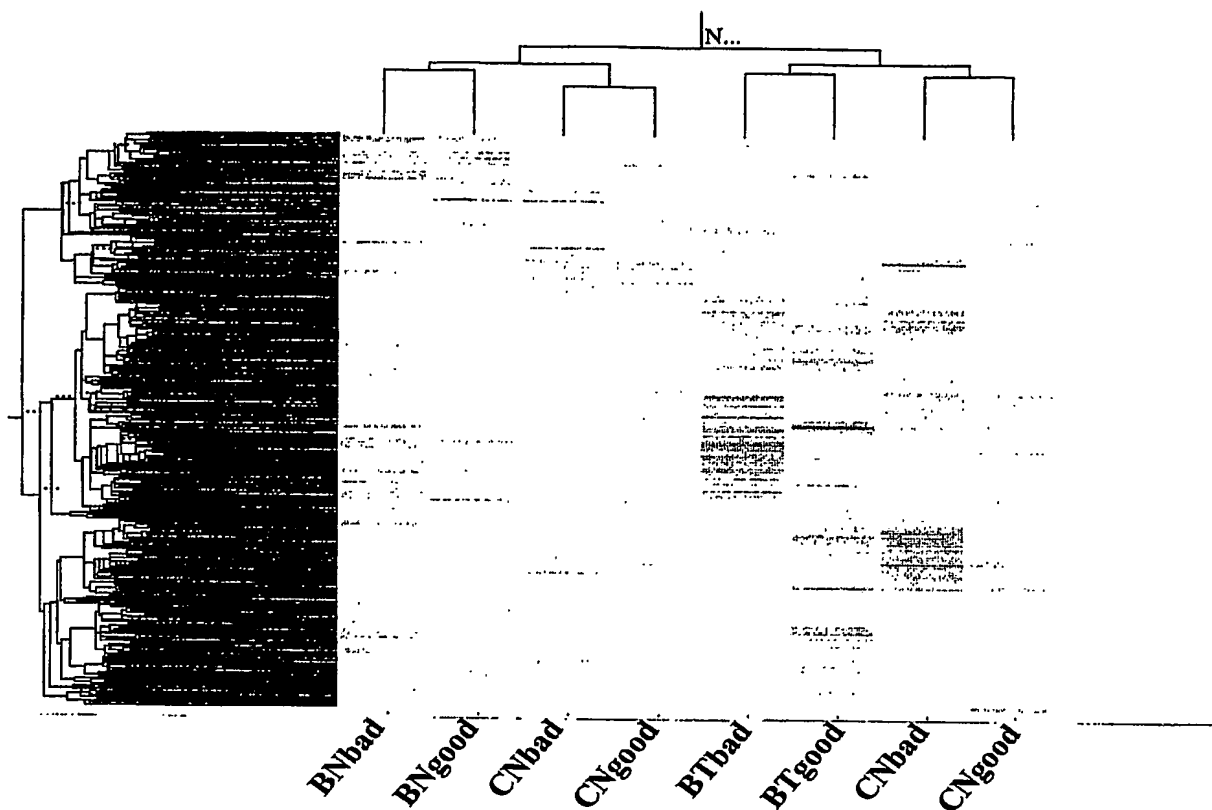
【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】全遺伝子発現プロファイルより作製したサンプル系統樹を示す図である。サンプル間の発現様式の類似性で遺伝子が再配列され、さらに全遺伝子の発現様式の類似性から、サンプルが再配列されて、近縁関係が系統樹として示される。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】 癌の評価方法の提供。

【課題】 癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体からtotal RNAを採取し、

(b) 表 1 ～ 8 に示される遺伝子の中の少なくとも 1 つ以上の遺伝子の発現量を測定し、

(c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること

を含む前記方法。

【解決手段】

【選択図】 なし



特願 2003-299363

出願人履歴情報

識別番号

[899000057]

1. 変更年月日
[変更理由]

1999年 9月17日

新規登録

住所
氏名

東京都千代田区九段南四丁目8番24号
学校法人日本大学